

細胞への直接物質輸送のためのナノストロースタンピング法の 画像認識を用いた自動化

Image-recognition-assisted automation of nanostraw stamping for direct delivery of molecules into cells

早大理工 ○池田 翔, 小熊 奏一郎, 藤原 彩, 鞍掛 碧流, 小山 和洋, 三宅 文雄, 谷井 孝至

Waseda Univ. ○S. Ikeda, S. Oguma, A. Fujiwara, H. Kurakake, K. Oyama, T. Miyake, T. Tanii

E-mail: ikeda@tanii.nano.waseda.ac.jp

【研究背景と目的】ナノストロースタンピング法は、スタンプ後の細胞生存率を低下させず、高い導入率の下で細胞内に物質を導入できる直接的な物質導入法である[1]。エンドサイトーシスを介さず直接的に物質を導入でき、タンパク質等の導入による細胞への新機能付与、薬物導入に対する細胞応答評価などへの応用が期待されている。しかしながら、確実な物質導入や自動化・高速化には、ナノストローの精密位置制御が必須要件となる。ナノストローの長さはディッシュ底面に接着している細胞の厚み ($\sim 10\ \mu\text{m}$) と同程度であるので、この範囲に収まるようにナノストローを細胞に刺入して保持し、物質を拡散させ、導入する必要がある。本研究では、倒立顕微鏡のCMOSカメラを用いた画像認識とステッピングモータによる位置制御の連携によるナノストローの刺入深さ制御とスタンピング自動化の実行可能性を評価した。

【実験方法と結果】トラックエッチドメンブレンに無電解金めっきとドライエッチングを施してナノストローを形成した[1]。メンブレン表面に一樣に形成されたナノストローは、倒立型位相差顕微鏡の対物レンズを通した可視光照明により、細胞表面に接した状態でも無数の輝点として観察される。この輝点は、その先端位置が焦点に位置するとき、明瞭な像コントラストを生む。輪郭抽出フィルタを通して得られた輝度分散一位置特性は結像位置近傍で急峻なピークを示すの

で、ナノストローの刺入深さを判定するための指標となる (Fig. 1)。これにより、ディッシュ底面とナノストロー先端との間の鉛直方向の距離、さらには、ディッシュ底面に対するメンブレンの傾斜角を精密に制御できる。本実験では、ディッシュ底面にサブコンフルエントないしコンフルエントに成長した HeLa 細胞に、PBS で希釈した Calcein 蛍光色素 (1.6 mM) を導入し (刺入時間: 5 分間)、その蛍光像を取得することによって Calcein の導入率を評価した。本発表では、刺入深さ制御性および物質導入率に関する評価結果について報告する。なお、本研究は Waseda PoC Fund の助成を受けた。

[1] T. Miyake *et al.*, *Scientific Reports* 9 (2019) 6806

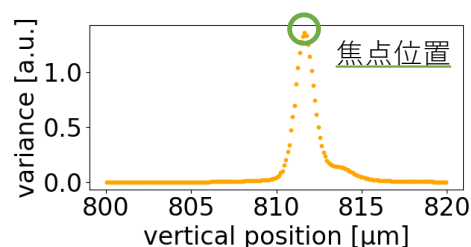


Fig. 1 Variance in the brightness of a contour-extracted image of a membrane with nanostraws obtained using the Laplacian filter. (a) (b)

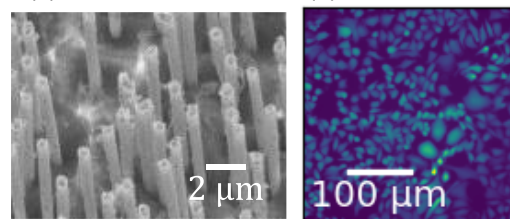


Fig. 2 (a) SEM micrograph of the membrane with nanostraws. (b) Fluorescence image of the Calcein-induced HeLa cells exhibiting fluorescence from Calcein uniformly.